



بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین

معاونت پژوهشی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین بتاتروفین

نگارنده: سمانه غلامی

استاد راهنما: دکتر کوروش گودرزوند چگینی

اساتید مشاور: دکتر نعمت اله غیبی، دکتر رضا فلک

محل اجرا: دانشگاه علوم پزشکی قزوین

سال تحصیلی ۹۴-۹۵

چکیده:

زمینه و هدف: بتاتروفین یک پروتئین از خانواده پروتئین های ANGPTL1 هاست که نقش کلیدی در تکثیر سلولهای بتا، احتمالاً درمان دیابت و یا تنظیم متابولیسم چربی دارد. عملکرد و سازوکار مولکولی این پروتئین به خوبی شناخته نشده است لذا تولید این پروتئین نوترکیب با بازده مناسب، برای تعیین نقش دقیق آن و احتمالاً استفاده از آن به عنوان کاندید یا مکمل دارویی بسیار حائز اهمیت است. از این رو در این پروژه تحقیقاتی تولید و بیان این پروتئین نوترکیب از نمونه انسانی و هم چنین نمونه موشی برای انجام تحقیقات بیشتر مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ژن کد کننده بتاتروفین با کمک PCR بر روی RNA استخراج شده از بافت کبد تکثیر یافت. سکانس تکثیر شده بعد از تایید سکانس در سیستم بیانی (pET21b- *E. coli* BL-21 (DE3)) بیان شد. بیان ژن کلون شده با کمک IPTG به عنوان القا کننده توسط SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. خالص سازی پروتئینها با استفاده از رزین Ni-IDA بر اساس میل ترکیبی آن به His-Tag پروتئین های نوترکیب انجام گرفت. میزان بازده محصول نوترکیب هم بعد از مراحل اپتیمایز شده با روش برادفورد اندازه گیری شد.

یافته ها: پروتئین نوترکیب بتاتروفین در انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت و غلظت 1mM IPTG بیان بالایی را نشان داد. نتایج SDS-PAGE، ژروتئین مورد نظر را با وزن تقریبی ۲۵/۴ کیلودالتون در مقابل مارکر وزنی استاندارد نشان داد. تقریباً تمامی محصول در فاز اینکلوژن بادی بیان گردید که در ادامه با کمک روش دنا تورا سیون اوره ۸ مولار به صورت محلول درآمد. تخلیص پروتئین نوترکیب در غلظت ۲۵۰-۵۰۰ میلی مولار ایمیدازول ستون کروماتوگرافی Ni-IDA انجام و توسط SDS-PAGE تایید گردید. میزان بازده محصول، به ازای یک لیتر محیط کشت مقدار ۲ میلی گرم بتاتروفین نوترکیب محاسبه شد.

نتیجه گیری: در این مطالعه بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب بتاتروفین در pET21b از کلونینگ cDNA بافت کبد بدست آمد. پروتئین بتاتروفین با کمک روش های در دسترس و با بازده بالا بصورت نوترکیب بیان شده و تخلیص گردید، بنابراین به آسانی می توان در مطالعات بعدی از آن استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بتاتروفین، کلونینگ، بیان، تخلیص، pET21b، *E. coli* BL-21 (DE3)